

## (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局



(43) 国际公布日  
2006 年 10 月 19 日 (19.10.2006)

PCT

(10) 国际公布号  
WO 2006/108354 A1

(51) 国际专利分类号:  
A61K 31/4412 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)  
A61K 31/4418 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2006/000651

(22) 国际申请日: 2006 年 4 月 11 日 (11.04.2006)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
200510031445.7  
2005 年 4 月 13 日 (13.04.2005) CN

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 中南大学  
湘雅医院(XIANGYA HOSPITAL OF CENTRAL  
SOUTH UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国湖南省长沙  
市湘雅路87号, Hunan 410008 (CN)。

(72) 发明人; 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): 陶立坚(TAO, Lijian)  
[CN/CN]; 中国湖南省长沙市湘雅路87号, Hunan  
410008 (CN)。胡高云(HU, Gaoyun) [CN/CN]; 中国  
湖南省长沙市桐梓坡路172号, Hunan 410008 (CN)。

(74) 代理人: 长沙正奇专利事务所有限责任公司  
(CHANGSHA ZONEKEY PATENT LAW FIRM);  
中国湖南省长沙市八一路59#, Hunan 410001 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家  
保护): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,  
BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE,  
DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,  
KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD,  
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,  
OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,  
SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,  
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区  
保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY,  
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AT, BE, BG, CH,  
CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS,  
IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码及其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: 1-(SUBSTITUTED PHENYL)-5- METHYL- 2 - (1H) PYRIDONE IN THE MANUFACTURE OF MEDICA-  
MENTS FOR TREATING FIBROSIS IN ORGANS OR TISSUES

(54) 发明名称: 1- (取代苯基) -5-甲基-2- (1H) 吡啶酮(I)化合物 用于制备抗器官或组织纤维化药物的应用

(57) Abstract: The use of 1-(substituted phenyl )-5-methyl-2-(1H) pyridone in the manufacture of medicaments for treating fibrosis in organs or tissues . It indicates that 1-(substituted phenyl )-5-methyl-2-(1H) pyridone can inhibit the cells produced by various ECM , and their effect is higher than pirfenidone . Therefore, this type of compounds can be used as active ingredient for preparing the antifibrotic agent in organs and tissues.

(57) 摘要:

1-(取代苯基)-5-甲基-2-(1H)吡啶酮化合物在制备抗器官或组织纤维化的药物中的用途。结果表明, 1-(取代  
苯基)-5-甲基-2-(1H)吡啶酮对各种 ECM 产生细胞具有抑制作用, 且其作用强于吡非尼酮。因此, 该类化合物可作  
为制备抗器官或组织纤维化药物的活性成分。

WO 2006/108354 A1

1- (取代苯基) -5-甲基-2- (1H) 吡啶酮 (I) 化合物  
用于制备抗器官或组织纤维化药物的应用

### 技术领域

5 本发明涉及 1- (取代苯基) -5-甲基-2- (1H) 吡啶酮化合物的用途，具体地是在制备抗器官或组织纤维化药物中的用途。

### 背景技术

10 纤维化 (fibrosis) 可发生于多种器官或组织，引起器官或组织内实质细胞减少，纤维结缔组织增多，最终可导致器官或组织结构破坏和功能减退，甚至器官衰竭。目前对器官或组织纤维化的发生机制、诊断方法和防治措施已进行了广泛的研究，现有技术中，在某些方面已取得了长足的进步，但仍有一些关键问题没有解决。

15 现已知，器官或组织纤维化是由于多种原因（如炎症、免疫、毒物、缺血及血流动力学改变等）引起实质细胞损伤，然后导致实质细胞的炎症变性、坏死、并激活相应的巨噬细胞释放多种细胞因子和生长因子，这些因子激活静息状态的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 产生细胞，使之转化为肌成纤维细胞；肌成纤维细胞增殖，并分泌细胞因子，通过旁分泌方式再作用于巨噬细胞。肌成纤维细胞可合成大量胶原等 ECM 成分，同时 ECM 降解减少，从而造成器官或组织纤维化。因此，器官或组织纤维化的发生和发展是细胞、细胞因子和 ECM 等相互作用、多因素参加的结果。鉴于 20 ECM 产生细胞在器官或组织纤维化形成中的重要作用，目前治疗器官或组织纤维化的重要靶标之一是抑制 ECM 产生细胞的增殖、活化和诱导其凋亡。

25 由于各器官或组织功能、形态的不同，以及各器官或组织主要组成细胞的不同，使得不同器官或组织的纤维化在其发病机理中既有共性、也有个性；因此，在不同器官或组织纤维化的发病机制和治疗靶点上也存在一定的差异。以 ECM 主要产生细胞为例，肝脏中是肝星状细胞，肾小球中为肾小球系膜细胞，肾间质中为肾间质成纤维细胞，肺 30 脏中为肺成纤维细胞，心脏中为心肌成纤维细胞，腹膜中为腹膜间皮细胞。

吡啶酮类化合物在现有技术中已有公开。

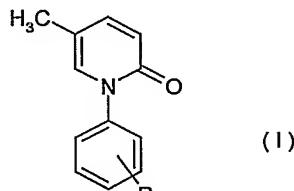
美国专利 US3839346A 公开了下式结构的吡啶酮类化合物。



其中，取代基 R 数目为 0 或 1，R 取代基的种类代表硝基、氯原子、烷基、甲氧基。 35 并公开了此类吡啶酮具有抗炎、解热、降低血清尿酸水平、止痛等作用。

美国专利 US4052509A 也公开了式 (0) 结构的化合物，其中具体公开了苯环上的取代基为硝基、甲氧基、对甲基、三氟甲基、氯原子，还具体公开了苯环上没有取代基的化合物，即 1-苯基-5-甲基-2- (1H) 吡啶酮。这些化合物具有良好的抗炎和镇痛活性，并且毒性低。

5 中国专利 ZL02114190.8 提供了一类吡啶酮化合物，具有如下的结构。



10

当 n=1 时，所述的取代基 R 表示 F、Br、I。

当 n=2 时，所述的取代基 R 表示 F、Cl、Br、I，饱和直链烃基、氧代饱和直链烃基、卤代饱和直链烃基。

所述的取代基团 R 在苯环上的位置具有邻位、间位、对位等方式。

15

现有技术中 (EP1138329A)，已知的一种有效的抗纤维化的化合物是吡非尼酮 (pirfenidone， PFD, 5-甲基 1-苯基 2 (1 氢) 吡啶酮)。实验表明，在肾纤维化、肺纤维化动物实验和特异性肺纤维化病人的临床治疗中，吡非尼酮均具有阻止甚至逆转 ECM 聚积的作用 (Shimizu T, Fukagawa M, Kuroda T, et al. Pirfenidone prevents collagen accumulation in the remnant kidney in rats with partial nephrectomy. Kidney Int, 1997,52 (Suppl 63) : S239-243; Raghu G, Johnson WC, Lockhart D, et al. Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis with a new antifibrotic agent, pirfenidone. Am J Respir Crit Care Med, 1999,159 : 1061-1069)，能够防止甚至逆转纤维化发生和瘢痕形成，这已经在大量的体外和动物实验中得到证实。吡非尼酮抗纤维化作用的机制尚处于研究之中，但大量的研究已经证明吡非尼酮是一种有效的细胞因子抑制剂，能够通过参与调节某些因子，抑制成纤维细胞的生物学活性，导致细胞增殖受抑，基质胶原合成减少。

20

美国专利US5, 716, 632中宣称包括下列化合物内的一些化合物也具有吡非尼酮一样的抗纤维化作用，但是除现有技术中的5-甲基-1-苯基-2- (1H) 吡啶酮 (吡非尼酮) 外，没有提供实验数据证明该论断。这些化合物是：

30

5-甲基-1- (3-硝基苯基) -2- (1H) 吡啶酮，  
 5-甲基-1- (4'-甲氧基苯基) -2- (1H) 吡啶酮，  
 5-甲基-1-对甲苯基-2- (1H) 吡啶酮，  
 5-甲基-1- (3'-三氟甲基苯基) -2- (1H) 吡啶酮，  
 5-乙基-1-苯基-2- (1H) 吡啶酮，  
 5-甲基-1- (3-硝基苯基) -2- (1H) 吡啶酮。

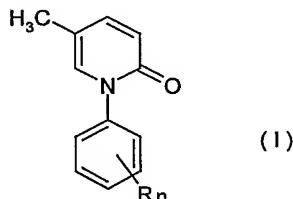
35

本申请发明人曾在《中南大学学报》(医学版) (2004, 29 (2)) 上公开了化合物 1- (3-氟苯基) -5-甲基-2- (1H) 吡啶酮对肾成纤维细胞的细胞实验，结果显示其具有抑制肾成纤维细胞生长的作用。

## 发明内容

本发明是在上述现有技术基础上，进一步公开吡啶酮类化合物在制备抗器官或组织纤维化药物中的应用。

5 本发明提供如式(I)所示化合物用于制备抗器官或组织纤维化药物的应用；



10

当 n=1 时，所述的取代基 R 表示 F、Cl、Br、I、硝基、烷基、氧代烷基、卤代烷基；

当 n=2 时，所述的取代基 R 表示 F、Cl、Br、I，烷基、氧代烷基、卤代烷基。

15 上述化合物可以用于制备一种广谱的抗器官或组织纤维化的药物。

本发明中，所谓“抗器官或组织纤维化”是指防止器官或组织中纤维化的产生，阻止器官或组织中纤维化的发展，或/和逆转器官或组织中已经形成的纤维化。

其中，优选 n=1 时，R=F、Br、I；

当 n=2 时，R=F、Cl、Br、I，饱和直链烃基，氧代饱和直链烃基、卤代饱和直链烃基；R 取代基在苯环上的位置具有邻位、间位或对位。

20 最优选氟原子的位置为间位（即 3-氟取代）。

本发明所涉及的烷基是指直链或支链的具有 1-6 个碳原子数的烷基，优选 1-4 个碳原子。

根据本发明，可优选的化合物还包括下列化合物：

25 式(I)的 1 - 取代苯基- 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮中，n=1，R=Br，如：

1 - (2 - 溴苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮；  
1 - (3 - 溴苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮；  
1 - (4 - 溴苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮；或

式(I)的 1 - 取代苯基- 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮中，n=1，R=F，如：

1 - (2 - 氟苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮；  
1 - (3 - 氟苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮；  
1 - (4 - 氟苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮；或

式(I)的 1 - 取代苯基- 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮中，n=1，R=I，如：

1 - (2 - 碘苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮；  
1 - (3 - 碘苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮；  
1 - (4 - 碘苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮；或

式(I)的 1 - 取代苯基- 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮中，n=2，R=F、Br 或 Cl，如：

1 - (2,3-二溴苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮；

1 - (2,4-二溴苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (2,5-二溴苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (2,6-二溴苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (3,4-二溴苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 5 1 - (3,5-二溴苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (2,3-二氯苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (2,4-二氯苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (2,5-二氯苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 10 1 - (2,6-二氯苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (3,5-二氯苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (2,3-二氟苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (2,4-二氟苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (2,5-二氟苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 15 1 - (2,6-二氟苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (3,5-二氟苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮; 或

式(I)的 1 -取代苯基- 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮中, n=1 或 2, R = 三氟甲基, 如:

1 - (2-三氟甲基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (4-三氟甲基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (2,3-三氟甲基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 20 1 - (2,4-三氟甲基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (2,5-三氟甲基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (2,6-三氟甲基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (3,4-三氟甲基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (2,5-三氟甲基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮; 或

25 式(I)的 1 -取代苯基- 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮中, n=1 或 2, R = 甲基, 如:

1 - (2-甲基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (3-甲基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (2,3-二甲基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (2,4-二甲基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 30 1 - (2,5-二甲基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (2,6-二甲基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (3,4-二甲基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (2,5-二甲基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮; 或

式(I)的 1 -取代苯基- 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮中, n=1 或 2, R = 甲氧基, 如:

35 1 - (2-甲氧基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (3-甲氧基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (2,3-二甲氧基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (2,4-二甲氧基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (2,5-二甲氧基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 40 1 - (2,6-二甲氧基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (3,4-二甲氧基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (3,5-二甲氧基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮。

根据本发明提供的实施例, 优先用于制备抗肾间质纤维化、抗肾小球硬化、抗肝纤维化、抗肺纤维化、抗腹膜纤维化、抗心肌纤维化、抗皮肤纤维化、抗手术后粘连、抗

良性前列腺肥大症、抗骨骼肌纤维化、抗硬皮病、抗阿尔茨海默病或抗血管纤维化疾病的药物。

根据本发明的实施例，通式(I)的化合物优先用于制备治疗由于血吸虫病引起的肝纤维化的药物。

5 根据本发明的实施例，通式(I)的化合物优先用于制备治疗由于糖尿病引起的肾小球硬化的药物。

根据本发明的实施例，通式(I)的化合物优先用于制备治疗由于输尿管梗阻或糖尿病引起的肾间质纤维化的药物。

本发明公开的式(I)化合物给药方式为所说的化合物口服、注射或外用给药；或  
10 与药用辅料及其它药物做成适当的形式给药。

本发明对各种导致器官或组织纤维化的ECM产生细胞进行细胞实验，同时还对各类纤维化疾病的动物模型进行了实验。结果表明，1-(取代苯基)-5-甲基-2-(1H)吡啶酮对各种ECM产生细胞具有抑制作用，且其作用强于吡非尼酮。因此，该类化合物可作为制备抗器官或组织纤维化药物的活性成分。

### 15 具体实施例

本发明中以1-(3-氟苯基)-5-甲基-2-(1H)吡啶酮为例说明1-(取代基苯基)-5-甲基-2-(1H)吡啶酮化合物在制备抗纤维化药物中的应用。1-(3-氟苯基)-5-甲基-2-(1H)吡啶酮可按中国专利ZL02114190.8中公开的方法制备。

### 20 实施例1

1- (3-氟苯基) -5-甲基-2- (1H) 吡啶酮(氟非尼酮, AKF-PD) 与吡非尼酮(pirfenidone, PFD) 抑制小鼠肾小球系膜细胞增殖的作用比较，用噻唑蓝(MTT)方法检测。细胞用含10%小牛血清的DMEM培养基常规培养，将细胞制成 $1\times10^5/ml$ 的细胞悬液，每孔100ul接种于96孔板中。待细胞贴壁后换无血清DMEM培养基，24小时后弃去无血清培养基，换含不同浓度氟非尼酮和吡非尼酮的含10%小牛血清的培养基，每个浓度设5个复孔。分别于加药后8、20、44小时后，每孔加MTT10ul，4小时后将MTT吸出，每孔加MTT溶解液100ul，15min后待MTT完全溶解，酶标仪570nm测OD值。结果见表1。

30 表1 氟非尼酮与吡非尼酮对小鼠肾小球系膜细胞的影响

组别	各时间点光密度值		
	12h	24h	48h
对照组	0.363±0.002	0.591±0.002	0.851±0.009
氟非尼酮 100μg/ml	0.368±0.003	0.594±0.003	0.812±0.002*

氟非尼酮 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.363±0.002	0.579±0.001*	0.675±0.006**
氟非尼酮 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.361±0.002	0.557±0.002**	0.583±0.005***
氟非尼酮 2500 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.355±0.002	0.541±0.002***	0.552±0.004***
吡非尼酮 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.362±0.003	0.591±0.002	0.830±0.003*†
吡非尼酮 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.360±0.003	0.590±0.001***	0.707±0.002***‡
吡非尼酮 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.362±0.002	0.565±0.001***‡	0.599±0.004***‡
吡非尼酮 2500 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.362±0.002 <sup>+</sup>	0.548±0.002*** <sup>+</sup>	0.559±0.002***

\*p&lt;0.05 vs 对照组

\*\*p&lt;0.01 vs 对照组

\*\*\*p&lt;0.001 vs 对照组

+p&lt;0.05 vs 氟非尼酮

++p&lt;0.01 vs 氟非尼酮

+++p&lt;0.001 vs 氟非尼酮

在 24 小时，氟非尼酮 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  能抑制小鼠肾小球系膜细胞的增殖，而吡非尼酮 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  不能抑制小鼠肾小球系膜细胞的增殖； 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的氟非尼酮和吡非尼酮 均能抑制小鼠肾小球系膜细胞的增殖，但氟非尼酮 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的作用强于同等剂量的 pirfenidone。在 48 小时， 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  氟非尼酮和吡非尼酮均能抑制小鼠肾小球系膜细胞的增殖，但氟非尼酮在 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的作用强于同等剂量的 pirfenidone。

结论：氟非尼酮能抑制小鼠肾小球系膜细胞的增殖，且其作用强于 pirfenidone。

10

## 实施例 2

1- (3-氟苯基) -5-甲基-2- (1H) 吡啶酮 (氟非尼酮) 与吡非尼酮抑制大鼠心肌成纤维细胞增殖的作用比较，用噻唑蓝 (MTT) 方法检测。细胞用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基常规培养，将细胞制成  $1\times10^5/\text{ml}$  的细胞悬液，每孔 100ul 接种于 96 孔板中。待细胞贴壁后换无血清 DMEM 培养基，24 小时后弃去无血清培养基，换含不同浓度氟非尼酮和吡非尼酮的含 10% 小牛血清的培养基，每个浓度设 5 个复孔。分别于加药后 8、20、44 小时后，每孔加 MTT10ul，4 小时后将 MTT 吸出，每孔加 MTT 溶解液 100ul，15min 后待 MTT 完全溶解，酶标仪 570nm 测 OD 值。结果见表 2。

表 2 氟非尼酮与 吡非尼酮 对大鼠心肌成纤维细胞的影响

20

组别	各时间点光密度值		
	12h	24h	48h
对照组	0.330±0.002	0.445±0.016	0.684±0.008
氟非尼酮 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.328±0.010	0.426±0.006*	0.620±0.018***
氟非尼酮 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.326±0.003	0.408±0.009**	0.580±0.014***
氟非尼酮 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.332±0.006	0.392±0.008**	0.538±0.009***
氟非尼酮 2500 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.325±0.008	0.377±0.013***	0.514±0.005***
吡非尼酮 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.330±0.014	0.429±0.009*	0.654±0.007*†
吡非尼酮 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.329±0.013	0.411±0.006*	0.612±0.014***‡

吡非尼酮 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.331±0.009	0.403±0.010** <sup>+</sup>	0.597±0.013*** <sup>+++</sup>
吡非尼酮 2500 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.329±0.008	0.392±0.009** <sup>+</sup>	0.566±0.027**

<sup>\*</sup>p<0.05 vs 对照组<sup>\*\*</sup>p<0.01 vs 对照组<sup>\*\*\*</sup>p<0.001 vs 对照组<sup>+</sup>p<0.05 vs 氟非尼酮<sup>++</sup>p<0.01 vs 氟非尼酮<sup>+++</sup>p<0.001 vs 氟非尼酮

在 24 小时，100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  氟非尼酮和吡非尼酮均能抑制大鼠心肌成纤维细胞的增殖，但氟非尼酮 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的作用强于同等剂量的吡非尼酮；在 48 小时，100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  氟非尼酮 和吡非尼酮均能抑制大鼠心肌成纤维细胞的增殖，但氟非尼酮 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的作用强于同等剂量的吡非尼酮。

结论：氟非尼酮能抑制大鼠心肌成纤维细胞的增殖，且其作用强于吡非尼酮。

10

### 实施例 3

1- (3-氟苯基) -5-甲基-2- (1H) 吡啶酮 (氟非尼酮) 与吡非尼酮抑制人肝星状细胞增殖的作用比较，用噻唑蓝 (MTT) 方法检测。细胞用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基常规培养，将细胞制成  $1\times10^5/\text{ml}$  的细胞悬液，每孔 100ul 接种于 96 孔板中。待细胞贴壁后换无血清 DMEM 培养基，24 小时后弃去无血清培养基，换含不同浓度氟非尼酮和吡非尼酮的含 10% 小牛血清的培养基，每个浓度设 5 个复孔。分别于加药后 8、20、44 小时后，每孔加 MTT 10ul，4 小时后将 MTT 吸出，每孔加 MTT 溶解液 100ul，15min 后待 MTT 完全溶解，酶标仪 570nm 测 OD 值。结果见表 3。

表 3 氟非尼酮与 吡非尼酮 对人肝星状细胞的影响

20

组别	各时间点光密度值		
	12h	24h	48h
对照组	0.207±0.001	0.370±0.002	0.455±0.002
氟非尼酮 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.202±0.001	0.366±0.002	0.442±0.006
氟非尼酮 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.202±0.001*	0.341±0.003**	0.406±0.002***
氟非尼酮 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.198±0.001**	0.312±0.003***	0.385±0.004***
氟非尼酮 2500 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.195±0.002**	0.273±0.005***	0.246±0.001***
吡非尼酮 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.206±0.003	0.371±0.001	0.447±0.003
吡非尼酮 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.202±0.001*	0.345±0.002**	0.413±0.001*** <sup>++</sup>
吡非尼酮 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.201±0.001*	0.330±0.001*** <sup>++</sup>	0.402±0.001*** <sup>++</sup>
吡非尼酮 2500 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.198±0.001**	0.278±0.001*** <sup>+</sup>	0.306±0.002*** <sup>+++</sup>

<sup>\*</sup>p<0.05 vs 对照组<sup>\*\*</sup>p<0.01 vs 对照组<sup>\*\*\*</sup>p<0.001 vs 对照组<sup>+</sup>p<0.05 vs 氟非尼酮<sup>++</sup>p<0.01 vs 氟非尼酮<sup>+++</sup>p<0.001 vs 氟非尼酮

从 12 小时开始，500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的氟非尼酮和吡非尼酮均能

抑制人肝星状细胞的增殖；但 24 小时氟非尼酮 1000 μ g/ml、2500 μ g/ml 的作用强于同等剂量的吡非尼酮，48 小时氟非尼酮 500 μ g/ml、1000 μ g/ml、2500 μ g/ml 的作用强于同等剂量的 pirfenidone。

结论：氟非尼酮能抑制人肝星状细胞的增殖，且其作用强于吡非尼酮。

5

#### 实施例 4

1- (3-氟苯基) -5-甲基-2- (1H) 吡啶酮 (氟非尼酮) 与吡非尼酮抑制大鼠肺成纤维细胞增殖作用的比较，用噻唑蓝 (MTT) 方法检测。细胞用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基常规培养，将细胞制成  $1 \times 10^5/\text{ml}$  的细胞悬液，每孔 100ul 接种于 96 孔板中。待细胞贴壁后换无血清 DMEM 培养基，24 小时后弃去无血清培养基，换含不同浓度氟非尼酮和吡非尼酮的含 10% 小牛血清的培养基，每个浓度设 5 个复孔。分别于加药后 8、20、44 小时后，每孔加 MTT 10ul，4 小时后将 MTT 吸出，每孔加 MTT 溶解液 100ul，15min 后待 MTT 完全溶解，酶标仪 570nm 测 OD 值。结果见表 4。

15

表 4 氟非尼酮与 吡非尼酮 对大鼠肺成纤维细胞的影响

组别 各时间点光密度值

	12h	24h	48h
对照组	0.235±0.003	0.302±0.008	0.402±0.015
氟非尼酮 100ug/ml	0.235±0.009	0.301±0.013	0.399±0.008
氟非尼酮 500 ug/ml	0.237±0.016	0.295±0.017	0.376±0.006*
氟非尼酮 1000 ug/ml	0.233±0.011	0.267±0.016**	0.369±0.009**
氟非尼酮 2500 ug/ml	0.235±0.005	0.173±0.015***	0.241±0.008***
吡非尼酮 100 ug/ml	0.234±0.012	0.304±0.021	0.400±0.011
吡非尼酮 500 ug/ml	0.231±0.012	0.294±0.020	0.386±0.009**++
吡非尼酮 1000 ug/ml	0.233±0.005	0.291±0.024++	0.379±0.010 **+++
吡非尼酮 2500 ug/ml	0.236±0.008	0.278±0.005**+++	0.245±0.008***

\*p<0.05 vs 对照组      \*\*p<0.01 vs 对照组      \*\*\*p<0.001 vs 对照组

+p<0.05 vs 氟非尼酮    ++p<0.01 vs 氟非尼酮    +++ p<0.001 vs 氟非尼酮

20

在 24 小时，氟非尼酮 1000 μ g/ml 能抑制大鼠肺成纤维细胞的增殖，氟非尼酮 2500 μ g/ml 和吡非尼酮 2500 μ g/ml 均能抑制大鼠肺成纤维细胞的增殖，但氟非尼酮 2500 μ g/ml 的作用强于同等剂量的吡非尼酮。在 48 小时，500 μ g/ml、1000 μ g/ml、2500 μ g/ml 的氟非尼酮和吡非尼酮均能抑制大鼠肺成纤维细胞的增殖，但氟非尼酮 500 μ g/ml、1000 μ g/ml 的作用强于同等剂量的吡非尼酮。

结论：氟非尼酮能够抑制肺成纤维细胞的增殖，且其作用强于吡非尼酮。

### 实施例 5

1- (3-氟苯基) -5-甲基-2- (1H) 吡啶酮 (氟非尼酮) 与吡非尼酮抑制人皮肤疤痕成纤维细胞增殖作用的比较，用噻唑蓝 (MTT) 方法检测。细胞用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基常规培养，将细胞制成  $1 \times 10^5/\text{ml}$  的细胞悬液，每孔 100ul 接种于 96 孔板中。待细胞贴壁后换无血清 DMEM 培养基，24 小时后弃去无血清培养基，换含不同浓度氟非尼酮和吡非尼酮的含 10% 小牛血清的培养基，每个浓度设 5 个复孔。分别于加药后 8、20、44 小时后，每孔加 MTT 10ul，4 小时后将 MTT 吸出，每孔加 MTT 溶解液 100ul，15min 后待 MTT 完全溶解，酶标仪 570nm 测 OD 值。结果见表 5。

表 5 氟非尼酮与 吡非尼酮 对人皮肤疤痕成纤维细胞的影响

组别	各时间点光密度值		
	12h	24h	48h
对照组	0.195±0.008	0.263±0.005	0.381±0.001
氟非尼酮 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.192±0.010	0.245±0.002*	0.366±0.006*
氟非尼酮 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.192±0.006	0.238±0.004*	0.345±0.007*
氟非尼酮 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.192±0.009	0.221±0.004**	0.323±0.009***
氟非尼酮 2500 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.190±0.002	0.198±0.008***	0.267±0.001***
吡非尼酮 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.194±0.004	0.250±0.003*	0.366±0.006*
吡非尼酮 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.191±0.008	0.245±0.004* <sup>+</sup>	0.350±0.003*** <sup>++</sup>
吡非尼酮 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.190±0.008	0.330±0.001* <sup>++</sup>	0.328±0.004*** <sup>++</sup>
吡非尼酮 2500 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.193±0.004	0.278±0.001*** <sup>++</sup>	0.264±0.005***

\*p<0.05 vs 对照组      \*\*p<0.01 vs 对照组      \*\*\*p<0.001 vs 对照组

+p<0.05 vs 氟非尼酮      ++p<0.01 vs 氟非尼酮      +++ p<0.001 vs 氟非尼酮

在 24 小时，100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 氟非尼酮和吡非尼酮均能抑制人皮肤疤痕成纤维细胞的增殖，但氟非尼酮 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的作用强于同等剂量的吡非尼酮。在 48 小时，氟非尼酮 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的作用强于同等剂量的吡非尼酮。

结论：氟非尼酮能抑制人皮肤疤痕成纤维细胞的增殖，且其作用强于吡非尼酮。

### 实施例 6

1- (3-氟苯基) -5-甲基-2- (1H) 吡啶酮 (氟非尼酮) 与吡非尼酮抑制人腹膜间皮细胞增殖作用的比较，用噻唑蓝 (MTT) 方法检测。细胞用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基常规培养，将细胞制成  $1 \times 10^5/\text{ml}$  的细胞悬液，每孔 100ul 接种于 96 孔板中。待细胞

贴壁后换无血清 DMEM 培养基，24 小时后弃去无血清培养基，换含不同浓度氟非尼酮和吡非尼酮的含 10% 小牛血清的培养基，每个浓度设 5 个复孔。分别于加药后 8、20、44 小时后，每孔加 MTT 10ul，4 小时后将 MTT 吸出，每孔加 MTT 溶解液 100ul，15min 后待 MTT 完全溶解，酶标仪 570nm 测 OD 值。结果见表 6。

5 表 6 氟非尼酮与吡非尼酮对人腹膜间皮细胞的影响

组别 各时间点光密度值

	12h	24h	48h
对照组	0.347±0.006	0.585±0.002	0.814±0.003
氟非尼酮 100 ug/ml	0.344±0.004	0.583±0.004	0.807±0.007
氟非尼酮 500 ug/ml	0.344±0.005	0.573±0.004*	0.758±0.010*
氟非尼酮 1000 ug/ml	0.343±0.004	0.553±0.004***	0.704±0.003***
氟非尼酮 2500 ug/ml	0.346±0.005	0.502±0.003***	0.646±0.006***
吡非尼酮 100 ug/ml	0.346±0.006	0.584±0.005	0.810±0.006
吡非尼酮 500 ug/ml	0.343±0.004	0.577±0.003*	0.766±0.004***
吡非尼酮 1000 ug/ml	0.363±0.003	0.563±0.003*** <sup>+</sup>	0.714±0.002*** <sup>+++</sup>
吡非尼酮 2500 ug/ml	0.345±0.005	0.512±0.006*** <sup>+</sup>	0.648±0.009***

\*p<0.05 vs 对照组

\*\*p<0.01 vs 对照组

\*\*\*p<0.001 vs 对照组

<sup>+</sup>p<0.05 vs 氟非尼酮

<sup>++</sup>p<0.01 vs 氟非尼酮

<sup>+++</sup>p<0.001 vs 氟非尼酮

在 24 小时，500 μg/ml、1000 μg/ml、2500 μg/ml 的氟非尼酮和吡非尼酮均能抑制人腹膜间皮细胞的增殖，氟非尼酮 1000 μg/ml、2500 μg/ml 的作用强于同等剂量的吡非尼酮；在 48 小时，氟非尼酮 1000 μg/ml 抑制人腹膜间皮细胞增殖的作用强于同等剂量的吡非尼酮。

结论：氟非尼酮能够抑制人腹膜间皮细胞的增殖，且其作用强于吡非尼酮。

注：上述实验所用细胞除心肌成纤维细胞、皮肤疤痕成纤维细胞和腹膜间皮细胞是用已知的方法进行原代培养获得外，其他细胞均有商品化产品可供购买。

以下实施例为 1-(3-氟苯基)-5-甲基-2-(1H) 吡啶酮(I) 化合物(氟非尼酮)对各种纤维化动物模型所进行的实验。其中，该化合物与 5% 的羧甲基纤维素钠溶液配制成悬浊液给药。

20

### 实施例 7

#### 氟非尼酮抗肾小球硬化和肾间质纤维化的动物实验研究

##### 1. 实验方法：

选择用链脲佐菌素制造的 wistar 大鼠糖尿病肾病模型，观察氟非尼酮抗肾小球硬化和肾间质纤维化的效果。

Wistar 大鼠 (8 周龄、雄性、体重 180g~220g), 随机分正常组、糖尿病肾病模型组、糖尿病肾病缬沙坦组、糖尿病肾病氟非尼酮组

糖尿病大鼠模型制备采用链脲佐菌素(STZ) 55mg/kg 一次性腹腔注射法。

24 小时后, 空腹血糖维持在 13.9mmol/L, 或随机血糖 16.7mmol/L 以上, 尿糖阳性, 则糖尿病模型建立。4 周后糖尿病大鼠肾病 (尿蛋白>30mg/d) 则糖尿病大鼠肾病模型成立。氟非尼酮干预组 (氟非尼酮 500mg/kg·d, 灌胃)、缬沙坦药物干预组 (缬沙坦 30mg/Kg·d)、糖尿病模型组予等量生理盐水灌胃。药物连续干预 12 周后, 将大鼠全部处死取肾脏。

肾小球和肾小管间质损伤评分标准: 参照: Radford MG Jr, Donadio JV Jr, Bergstrahl EJ, et al. Predicting renal outcome in IgA nephropathy . J Am Soc Nephrol 1997, 8(2):199-207. 和赵雅妮, 李惊子, 王海燕等, 血管紧张素 II 受体拮抗剂与血管紧张素转换酶抑制剂抗大鼠肾脏纤维化的作用及机制探讨, 中华老年多器官疾病杂志, 2002; 1 (1): 36-40.

## 2. 实验结果:

肾组织显微镜检查结果:

表 7 各组肾小球和肾小管间质损伤指数比较

组别	例数	肾小球损伤指数	肾小管间质损伤指数
氟非尼酮组	5	1.29+-0.18	2.20+-0.14
缬沙坦组	8	1.36+-0.24	3.12+-0.64
糖尿病肾病模型组	9	1.63+-0.33	3.33+-0.54
正常组	5	0.21+-0.04	0.48+-0.14

## 3. 结论:

氟非尼酮组大鼠肾脏的肾小球及肾小管间质病变较糖尿病肾病模型组的大鼠肾脏病变明显减轻。说明, 氟非尼酮能有效治疗糖尿病肾病的肾小球硬化和肾间质纤维化。

## 实施例 8

氟非尼酮抗肺纤维化的动物实验研究

### 1. 实验方法:

选择用博莱霉素制造的 SD 大鼠肺纤维化模型, 观察氟非尼酮抗肺纤维化的效果。

Sprague-Dawley (6-8 周龄, 雄性大鼠, 体重 180g~220g ), 常规条件下喂养。将大鼠随机分为 3 组: 氟非尼酮干预组, 模型组, 假手术组。

对氟非尼酮组、模型组大鼠用博莱霉素按 6 mg/kg /4ml 生理盐水气管内缓慢注入, 对假手术组大鼠用等量生理盐水气管内缓慢注入。

氟非尼酮组 (氟非尼酮 500mg/kg), 在手术前 2 天至术后 27 天每日灌胃 1 次; 模型组、假手术组用等量生理盐水在手术前 2 天至术后 27 天每日灌胃 1 次。术后 27 天处死大鼠取肺组织。

肺组织显微镜检查 (HE 染色):

肺纤维化评分标准: 参考: Szapiel SV, Elson NA, Fulmer JD, Hunninghake GW, Crystal RG. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse. Am Rev Respir Dis. 1979 Oct;120(4):893-9.

## 5 2. 实验结果:

肺组织显微镜检查结果:

表 8 各组肺纤维化程度比较

纤维化程度	氟非尼酮组 (n=8)	模型组 (n=6)	假手术组 (n=7)
无	0 个	0 个	2 个
轻	6 个	1 个	5 个
中	1 个	4 个	0 个
重	1 个	1 个	0 个

## 3. 结论:

10 氟非尼酮组大鼠的肺纤维化病变较模型组明显减轻, 说明, 氟非尼酮能有效治疗肺纤维化疾病。

## 实施例 9

氟非尼酮抗肝纤维化的动物实验研究

### 15 1. 实验方法:

选择用血吸虫尾蚴感染制造的昆明小鼠血吸虫病肝纤维化模型, 观察氟非尼酮抗肝纤维化的效果。

16 昆明小鼠 (4-6 周龄、雄性、体重 18-22g), 随机分正常组、感染组、吡喹酮组、γ-干扰素组、氟非尼酮组。用 10 条血吸虫尾蚴感染小鼠腹部除毛部位。各组在感染尾蚴 8 周后, 用吡喹酮 (共 650mg/kg, 分 4 天,) 杀虫。杀虫后, 氟非尼酮组小鼠每天给予氟非尼酮 (500 mg/kg) 灌胃; γ-干扰素组小鼠每天给予 γ-干扰素 5 万单位肌注; 吡喹酮组及单纯感染组小鼠给予等量生理盐水每日灌胃 1 次; 连续用药 8 周后, 停药一周, 再处死小鼠取肝左叶做病理检查。

25 肝组织切片 HE 染色检查, 由于血吸虫尾蚴感染 16 周后, 肝脏血吸虫虫卵结节面积反映血吸虫肝纤维化的程度, 用 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文分析系统检查血吸虫虫卵结节面积, 分析每张切片典型的多卵和少卵结节各五个, 计算虫卵结节面积。

2. 实验结果:

表10 肝组织血吸虫虫卵结节面积 ( $\mu\text{m}^2$ ) 比较

		只数	均数	标准差
多卵	干扰素组	9	83706.7933	22943.48136
	AKFPD组	10	80155.1130	25419.81855
	单纯感染	10	111604.5880	30115.48606
	吡喹酮组	11	125823.3482	31708.84822
少卵	干扰素组	9	32407.1422	10078.29892
	AKFPD组	10	30266.6840	11069.88715
	单纯感染	10	41116.1340	11246.94456
	吡喹酮组	11	45418.5873	18001.53492

5

表11 肝组织血吸虫虫卵结节面积 ( $\mu\text{m}^2$ ) 比较的P值

组间比较	多卵	少卵
单纯感染组 vs 干扰素组	0.038	0.095
干扰素组 vs 吡喹酮组	0.004	0.058
吡喹酮组 vs 氟非尼酮组	0.002	0.032
单纯感染组 vs 吡喹酮组	0.306	0.516
单纯感染组 vs 氟非尼酮组	0.021	0.043
干扰素组 vs 氟非尼酮组	0.754	0.666

3. 结论:

氟非尼酮组血吸虫虫卵结节面积较单纯感染组和单纯吡喹酮治疗组小。说明，氟非尼酮能有效治疗血吸虫病肝纤维化。

10

实施例 10

氟非尼酮抗肾间质纤维化的动物实验研究

1. 实验方法:

15

选择用单侧输尿管结扎肾间质纤维化 SD 大鼠模型，观察氟非尼酮抗肾间质纤维化的效果。

SD 大鼠 (8 周龄、雄性、体重 180g~220g)，随机分为 4 组：假手术组，模型组，依那普利组 (依那普利，10mg/kg.d)，氟非尼酮组 (氟非尼酮，500mg/kg.d)。

20

除假手术组大鼠外，其他三组大鼠均在无菌条件下行左侧输尿管结扎术。术前器械消毒，假手术组大鼠除不结扎、不剪断输尿管外，所有处理同前。依那普利组和氟非尼酮组，于手术前 1 天灌胃给药至术后 14 天，模型组和假手术组以等量生理盐水灌胃至术后 14 天。术后 14 天处死大鼠，留取左侧梗阻肾标本，行 HE 染色检查。

肾组织肾小管间质损伤评分标准: 参照: Radford MG Jr, Donadio JV Jr, Bergstrahl EJ, et al. Predicting renal outcome in IgA nephropathy . J Am Soc Nephrol 1997, 8(2):199-207.

2. 实验结果:

各组大鼠左侧肾脏肾小管间质损伤指数结果

表 12 各组大鼠左侧肾脏镜下肾间质损伤指数的比较

组别	假手术组	模型组	依那普利组	氟非尼酮组
	(n=10)	(n=9)	(n=9)	(n=8)
肾间质损伤指数	1.33±0.58	10.24±0.99	9.21±0.64	6.43±1.28

3. 结论:

5 氟非尼酮组的肾间质损伤指数较模型组、依那普利组低，说明，氟非尼酮能有效治疗肾间质纤维化。

实施例 11

1- (3-氟苯基) -5-甲基-2 (1H) 吡啶酮口服给药急性毒性试验。

1、试验动物

10 昆明种小鼠 (KM) 50 只，雌雄各半，体重 18g~22g。由中南大学湘雅医学院实验动物学部提供。

2、试验方法

15 取健康 KM 小鼠 50 只，随机分成 5 组，每组 10 只，雌雄各半，给药前禁食 12h，不禁水。按 20ml/kg 体重灌胃给药，剂量组距比为 1:0.65，给药剂量为 1071mg/kg~6000mg/kg，给药后常规饲养，观察一次给药后 14 天内小鼠急性毒性反应及死亡情况，并对死亡动物进行解剖，肉眼观察各脏器变化。

3、结论

LD<sub>50</sub> 及 95% 可信限计算。

用 Bliss 方法计算，LD<sub>50</sub> 为 2979.89mg/kg，95% 可信限为 2402.70mg/kg~3695.73mg/kg，结果见表 13。

表 13 小鼠口服 1- (3-氟苯基) -5-甲基-2 (1H) 吡啶酮急性毒性试验结果

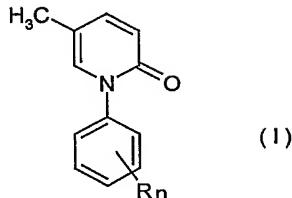
剂量 (mg/kg)	对数剂量 (X)	动物数 (只)	死亡数 (只)	死亡率 (%)	LD <sub>50</sub> 及 95% 可信限 (mg/kg)
6000.0	3.7782	10	9	90	
3900.0	3.5911	10	7	70	
2535.0	3.4040	10	4	40	2979.89
1647.8	3.2169	10	1	10	(2402.70~3695.73)
1071.0	3.0298	10	0	0	

25 小鼠一次灌胃 1- (3-氟苯基) -5-甲基-2 (1H) 吡啶酮，LD<sub>50</sub> 为 2979.89mg/kg，95% 可信限为 2402.70mg/kg~3695.73mg/kg。与文献报道的吡非尼酮的急性毒性结果 1112 mg/kg (《药学服务与研究》2005.3: 5 (1): 4823)、997.7 mg/kg (US5310562) 相比，本发明中所用的氟非尼酮毒性较小。

## 权利要求

1. 1- (取代苯基) -5-甲基-2- (1H) 吡啶酮 (I) 化合物用于制备抗器官或组织纤维化的药物的应用;

5



10 当 n=1 时，所述的取代基 R 表示 F、Cl、Br、I、硝基、烷基、氧代烷基、卤代烷基；

当 n=2 时，所述的取代基 R 表示 F、Cl、Br、I，烷基、氧代烷基、卤代烷基。

2、根据权利要求 1 所述的化合物在制备抗器官或组织纤维化药物的应用，其特征在于其中当 n=1 时，R=F、Br、I；当 n=2 时，R=F、Cl、Br、I，饱和直链烃基，氧代饱和直链烃基、卤代饱和直链烃基；R 取代基在苯环上的位置具有邻位、间位或对位。

15 3、根据权利要求 2 所述的化合物在制备抗器官或组织纤维化药物的应用，其特征在于：式(I)的 1 -取代苯基- 5 -甲基- 2 - (1H) 吡啶酮中，n= 1， R = Br，如：

1 - (2 -溴苯基) -5 -甲基- 2 - (1H) 吡啶酮；

1 - (3 -溴苯基) -5 -甲基- 2 - (1H) 吡啶酮；

20 1 - (4 -溴苯基) -5 -甲基- 2 - (1H) 吡啶酮；或

式(I)的 1 -取代苯基- 5 -甲基- 2 - (1H) 吡啶酮中，n= 1， R = F，如：

1 - (2 -氟苯基) -5 -甲基- 2 - (1H) 吡啶酮；

1 - (3 -氟苯基) -5 -甲基- 2 - (1H) 吡啶酮；

25 1 - (4 -氟苯基) -5 -甲基- 2 - (1H) 吡啶酮；或

式(I)的 1 -取代苯基- 5 -甲基- 2 - (1H) 吡啶酮中，n= 1， R = I，如：

1 - (2 -碘苯基) -5 -甲基- 2 - (1H) 吡啶酮；

1 - (3 -碘苯基) -5 -甲基- 2 - (1H) 吡啶酮；

30 1 - (4 -碘苯基) -5 -甲基- 2 - (1H) 吡啶酮；或

式(I)的 1 -取代苯基- 5 -甲基- 2 - (1H) 吡啶酮中，n= 2， R=F、Br 或 Cl，如：

1 - (2,3-二溴苯基) -5 -甲基- 2 - (1H) 吡啶酮；

1 - (2,4-二溴苯基) -5 -甲基- 2 - (1H) 吡啶酮；

1 - (2,5-二溴苯基) -5 -甲基- 2 - (1H) 吡啶酮；

1 - (2,6-二溴苯基) -5 -甲基- 2 - (1H) 吡啶酮；

1 - (3,4-二溴苯基) -5 -甲基- 2 - (1H) 吡啶酮；

35 1 - (3,5-二溴苯基) -5 -甲基- 2 - (1H) 吡啶酮；

1 - (2,3-二氯苯基) -5 -甲基- 2 - (1H) 吡啶酮；

1 - (2,4-二氯苯基) -5 -甲基- 2 - (1H) 吡啶酮；

1 - (2,5-二氯苯基) -5 -甲基- 2 - (1H) 吡啶酮；

1 - (2,6-二氯苯基) -5 -甲基- 2 - (1H) 吡啶酮；

40 1 - (3,5-二氯苯基) -5 -甲基- 2 - (1H) 吡啶酮；

1 - (2,3-二氟苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (2,4-二氟苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (2,5-二氟苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (2,6-二氟苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 5 1 - (3,5-二氟苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮; 或

式(I)的 1 - 取代苯基- 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮中, n=1 或 2, R = 三氟甲基, 如:

1 - (2-三氟甲基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (4-三氟甲基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 10 1 - (2,3-三氟甲基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (2,4-三氟甲基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (2,5-三氟甲基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (2,6-三氟甲基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 15 1 - (3,4-三氟甲基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (2,5-三氟甲基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮; 或

式(I)的 1 - 取代苯基- 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮中, n=1 或 2, R = 甲基, 如:

1 - (2-甲基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (3-甲基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (2,3-二甲基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (2,4-二甲基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 20 1 - (2,5-二甲基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (2,6-二甲基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (3,4-二甲基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (2,5-二甲基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮; 或

式(I)的 1 - 取代苯基- 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮中, n=1 或 2, R = 甲氧基, 如:

1 - (2-甲氧基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (3-甲氧基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (2,3-二甲氧基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (2,4-二甲氧基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (2,5-二甲氧基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 30 1 - (2,6-二甲氧基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (3,4-二甲氧基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮;  
 1 - (3,5-二甲氧基苯基) - 5 - 甲基- 2 - (1H) 吡啶酮。

4、根据权利要求 3 所述的化合物在制备抗器官或组织纤维化药物的应用, 其特征在于优选 R 为 3-氟。

35 5、根据权利要求 1 或 2 所述的化合物在制备抗器官或组织纤维化药物中的应用, 其特征在于所说的烷基是直链或支链的具有 1-6 个碳原子数的烷基, 优选 1-4 个碳原子。

6、根据权利要求 1 至 5 之一所述的应用, 其特征在于所说的纤维化是肾小球硬化、肾间质纤维化、肝纤维化、肺纤维化、腹膜纤维化、心肌纤维化、皮肤纤维化、手术后粘连、良性前列腺肥大症、骨骼肌纤维化、硬皮病、阿尔茨海默病、血管纤维化疾病。

40 7、根据权利要求 6 所述的应用, 其特征在于所说的肾小球硬化是由于糖尿病引起的病变。

8、根据权利要求 6 所述的应用, 其特征在于所说的肾间质纤维化是由于输尿管梗阻或

糖尿病引起的病变。

9、根据权利要求 6 所述的应用，其特征在于所说的肝纤维化是由于血吸虫病引起的病变。

10、根据权利要求 1~9 之一所述的应用，其特征在于给药方式为所说的化合物口服、  
5 注射或外用给药；或与药用辅料及其它药物做成适当的形式给药。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2006/000651

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC<sup>8</sup>: A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

CPRS

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI,EPODOC,PAJ, CNKI(CN), Chinese Pharmaceutical Abstract, CA, MEDLINE,EMBASE,  
pyridone,fibrosis,antifibrotic,pirfenidone,phenyl,methyl

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J.Cent South Univ(Med Sci),2004,29(2):139-141, Effects of 1-(3-fluorophenyl)-5-methyl-2-(1H )-pyridone on renal fibroblast in rats . TAO Li-jian et al	1-10
X	US 5716632 A (Margolin) (10.Feb.1998) (10.02.1998) examples	1-10
A	CN 1386737 A (xiangya hospital of central south university) (25.Dec.2002) (25.12.2002) see the whole document	1-10

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

- “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
- “L” document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&”document member of the same patent family

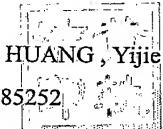
Date of the actual completion of the international search  
19.Jun.2006 (19.06.2006)

Date of mailing of the international search report

**20 · JUL 2006 (20 · 07 · 2006)**

Name and mailing address of the ISA/CN  
The State Intellectual Property Office, the P.R.China  
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China  
100088  
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer



HUANG, Yijie

Telephone No. 86-10-62085252

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/CN2006/000651

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
US 5716632 A	10.02.1998	WO9741830 A1 EP0902680 A1 JP2000510467T T	13. 11.1997 24. 03.1999 15.08.2000
CN 1386737 A	25.12.2002	none	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/CN2006/000651

**CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

A61K 31/4412 (2006.01) i

A61K 31/4418 (2006.01) i

A61P 43/00 (2006.01) i

**A. 主题的分类**

参见附加页

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

**B. 检索领域**

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC<sup>8</sup>: A61K, A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

中国专利文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

WPI,EPODOC,PAJ,CNKI(CN), 中国药学文摘库(CN), CHEMICAL ABSTRACT(US), MEDLINE,EMBASE

吡啶酮, 苯基, 甲基, 吡非尼酮, 纤维化, 细胞外基质, pyridone,fibrosis,antifibrotic,pirfenidone,phenyl,methyl,

**C. 相关文件**

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	《中南大学学报(医学版)》, 2004,29(2),139-141 页 《1-(3-氟苯基)-5-甲基-2-(1H)吡啶酮对鼠肾成纤维细胞的影响》陶立坚 等	1—10
X	US 5716632 A (Margolin) (10.2 月 1998) (10.02.1998) 实施例	1—10
A	CN 1386737 A (中南大学湘雅医学院) (25.12 月 2002) (25.12.2002) 全文	1—10

 其余文件在 C 栏的续页中列出。 见同族专利附件。

\* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&amp;” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

19.6 月 2006 (19.06.2006)

国际检索报告邮寄日期

20 · 7月 2006 (20 · 07 · 2006)

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员



电话号码: (86-10) 62085252

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号  
PCT/CN2006/000651

检索报告中引用的专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
US 5716632 A	10.02.1998	WO9741830 A1 EP0902680 A1 JP2000510467T T	13. 11.1997 24. 03.1999 15.08.2000
CN 1386737 A	25.12.2002	无	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2006/000651

主题的分类:

A61K 31/4412 (2006.01) i

A61K 31/4418 (2006.01) i

A61P 43/00 (2006.01) i